

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Die Bindung von Promazin- und Chlorpromazinmetaboliten an Albumin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Franziska Lier
aus Leipzig

Mainz 1971

1972

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Die Bindung von Promazin- und Chlorpromazinmetaboliten an Albumin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Franziska Lier
aus Leipzig

Mainz 1971



Dekan:	Prof. Dr. Dr. W. Ketterl
Referent:	Priv. Doz. Dr. Dr. J. Krieglstein
Korreferent:	Prof. Dr. G. Kuschinsky

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Januar 1972

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Methodik	4
Verwendete Substanzen	4
Bestimmung der Eiweißbindung	7
Bestimmung der Bestandteile	9
a) Farbttest	9
b) UV-Test	10
Berechnung des α -Wertes	11
Bestimmung des Verteilungskoeffizienten	12
Statistik	14
Ergebnisse	15
Der prozentuale Anteil α bzw. β an freier bzw. gebundener Substanz und seine Ab- hängigkeit von der Konzentration	15
Gesamtbindungskonstante K_1	18
Freie Reaktionsenergie ΔF^0	19
Apparente Bindungskonstante k^+	19
Verteilungskoeffizient P	20
Diskussion	38
Zusammenfassung	45
Literaturverzeichnis	47
Lebenslauf	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554401_0059

Einleitung

Plasmaproteine haben die Fähigkeit verschiedene organische und anorganische Substanzen reversibel zu binden. Dadurch besitzen diese Proteinmoleküle gleichsam eine "Vehikelfunktion" für niedermolekulare Substanzen (BENNHOLD, 1932). Dabei handelt es sich um eine Bindung der Substanzen an bestimmte Fraktionen des Serums oder an individuelle Proteine. Von besonderem Interesse ist die Plasmaproteinbindung von Stoffwechselprodukten, Hormonen, Vitaminen und Arzneimitteln. Hormone und Vitamine finden ihre Trägermoleküle hauptsächlich unter den α - und β -Globulinen. Körperfremde Substanzen, wie z.B. Arzneimittel, sind jedoch vorwiegend an das Serumalbumin gebunden (GOLDSTEIN, 1949; SCHOLTAN, 1962; BRODIE, 1964 und 1965). Ein Arzneimittel, das an Serumalbumin gebunden ist, muß als biologisch inaktiv angesehen werden. Nur die freie, ungebundene Substanz kann die Blutbahn verlassen und wirksam werden. Wenn aber der Anteil an freiem Arzneimittel durch deren Plasmaalbuminbindung bestimmt wird, werden Wirkungseintritt, Wirkungsdauer, Wirksamkeit, Verteilung im Organismus, Stoffwechsel und Ausscheidung im wesentlichen durch die "Eiweißbindung" beeinflusst (KRIEGLSTEIN, 1969).

Neben der Transportfunktion haben die Plasmaproteine aber auch "Depot" - und "Pufferfunktion" für die Arzneimittel

(KRIEGLSTEIN, 1969). Die Plasmaeiweißbindung stellt somit eine wichtige pharmakokinetische Größe dar.

Die Bindungsart zwischen Protein und Pharmakon ist noch nicht vollständig geklärt. Neuere Untersuchungen heben den hydrophoben Charakter der Wechselbeziehung "Protein-Pharmakon" hervor (HANSCH und Mitarb., 1965; JARDETZKY, 1967; SCHOLTAN, 1968; JÄHNCHEN und Mitarb., 1969). Bei der hydrophoben Bindung zeigen unpolare Gruppen die Tendenz, sich in wäßriger Lösung zu assoziieren und so die Berührung mit benachbarten Wassermolekülen zu vermindern (NEMETHY, 1967). Anscheinend ist dabei die Ladung keine unbedingte Voraussetzung für die Eiweißbindung der Arzneimittel. Die ionogene Bindung ist für viele ungeladene Moleküle auszuschließen (SCHOLTAN, 1964). Wasserstoffbrückenbindungen scheinen ebenfalls keine ausschlaggebende Rolle bei der Eiweißbindung von Pharmaka zu spielen, da in Untersuchungen über die Albuminbindung aliphatischer Bisguanylhydrazone (HOFMANN und Mitarb., 1970) keine oder nur eine geringe Bindung an Serumproteine festgestellt wurde, obwohl die Moleküle mehrere zur Wasserstoffbrückenbindung fähige Gruppen enthalten.

Eine Beteiligung der aromatischen Ringe im Molekül bei ihrer hydrophoben Bindung an Albumin konnte für Phenothiazine (JÄHNCHEN und Mitarb., 1969; KRIEGLSTEIN und KUSCHINSKY, 1969), sowie für Sulfonamide und Penicilline (JARDETZKY, 1967) nachgewiesen werden. JARDETZKY (1967) hat mit Hilfe der kernmagnetischen Resonanzspektrographie jene Atomgruppen im Molekül, die an der Komplexbildung mit dem Eiweiß unmittelbar beteiligt sind, bestimmt. Er zeigte, daß das Sulfonamidmolekül mit Hilfe des p-Aminobenzolsulfonsäure-Ringes am Albumin gebunden ist.

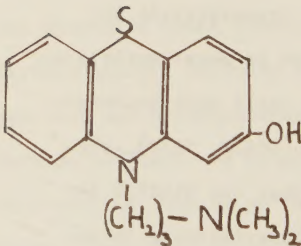
Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch die Untersuchung der Plasmaalbuminbindung einiger Metaboliten des Promazin (Verophen (R)) und Chlorpromazin (Megaphen (R)), weitere Aufschlüsse über die Art der Wechselbeziehungen zwischen Eiweiß und diesen Arzneimitteln zu erhalten. Da die lipophilen Substanzen in meist oxydativen Reaktionen zu wasser-löslicheren und damit ausscheidungs-fähigen Metaboliten verändert werden (GREIM, 1970), wurde versucht, gleichzeitig Aufschluß über den Einfluß der Hydrophilie der Metaboliten auf die Eiweißbindung zu erhalten.

Mit Hilfe der Sephadexgelfiltration (KRIEGLSTEIN und KUSCHINSKY, 1968) wurde die Bindung von 2-Hydroxypromazin, Chlorpromazin-N-oxid, Didesmethylchlorpromazin, Chlorpromazinsulfoxid, Promazin-N-oxid, Desmethylpromazinsulfoxid, Promazinsulfoxid und Didesmethylpromazin an Rinderserumalbumin untersucht.

Methodik

Die untersuchten Metaboliten des Promazin und Chlorpromazin, ihre chemische Bezeichnung, ihre Strukturformel sowie ihre im Text verwendeten Abkürzungen sind im folgenden Abschnitt zusammengefaßt:

I



10-(3'-Dimethylamino-propyl)

-2-hydroxyphenothiazin

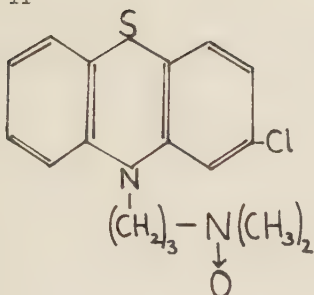
(RHONE-POULENC-PARIS,

N° 7447 R.P.)

Mol.-Gew.: 300, 42

Abkürzungen: 2-Hydroxypromazin, 2-OH-PZ

II



N-Oxyd von 10-(3'-Dimethyl-
amino-propyl)-2-chlor-pheno-
thiazinmaleat

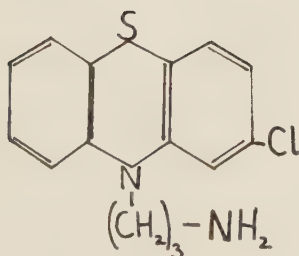
(RHONE-POULENC-PARIS,

No 9477 R.P. maléate)

Mol.-Gew.: 450,9

Abkürzungen: Chlorpromazin-
-N-oxid, CPZ-NO

III



10-(3'-Amino-propyl)-2-chlor-
phenothiazinmaleat

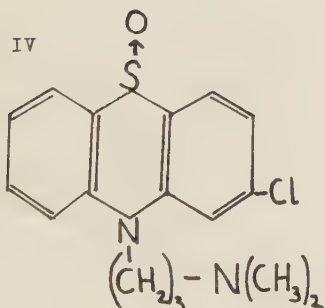
(RHONE-POULENC-PARIS,

N° 4728 R.P., maléate)

Mol.-Gew.: 406,88

Abkürzungen: Didesmethyl-
chlorpromazin, DDCPZ

IV



10-(3'-Dimethylamino-propyl)

-2-chlor-5-oxy-pheno-thiazin

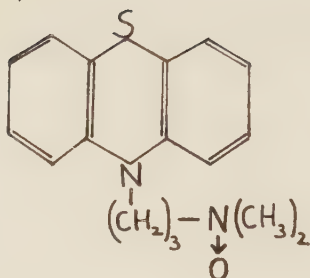
(RHONE-POULENC-PARIS,

N° 5293 R.P.)

Mol.-Gew.: 334,86

Abkürzungen: Chlorpromazin-
sulfoxid, CPZ-SO

V



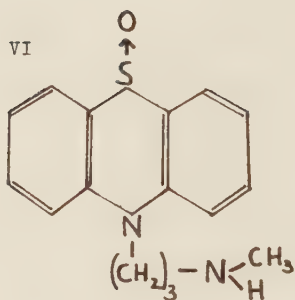
N-Oxyd von 10-(3'-Dimethyl-
amino-propyl)-phenothiazin-
oxalat

(RHONE-POULENC-PARIS,
N° 19 272 R.P., oxalate)

Mol.-Gew.: 390, 46

Abkürzungen: Promazin-N-
oxid, PZ-NO

VI



10-(3'-Methylamino-propyl)

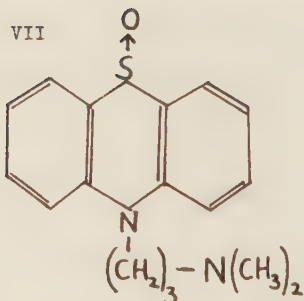
-5-oxy-phenothiazin-oxalat

(RHONE-POULENC-PARIS,
N° 19 311 R.P., oxalate)

Mol.-Gew.: 376,43

Abkürzungen: Desmethylpro-
mazinsulfoxid, DPZ-SO

VII



10-(3'-Dimethylamino-propyl)

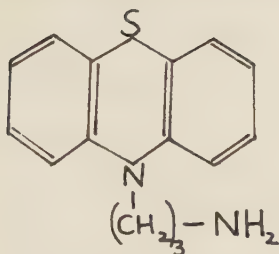
-5-oxy-phenothiazin

(RHONE-POULENC-PARIS,
No 19 106 R.P.)

Mol.-Gew.: 300, 42

Abkürzungen: Promazinsul-
foxid, PZ-SO

VIII



10-(3'-Amino-propyl)-pheno-
thiazinmaleat

(RHÔNE-POULENC-PARIS,
N^o 4653 R.P., maléate)

Mol.-Gew.: 372,44

Abkürzungen: Didesmethyl-
promazin, DDPZ

Bestimmung der Eiweißbindung

Die Albuminbindung der Metaboliten des Promazin und Chlorpromazin wurde mit Hilfe der Sephadexgelfiltration (KRIEGLSTEIN und KUSCHINSKY, 1968) untersucht.

Als Albumin stand Serumalbumin vom Rind (trocken, "reinst", Charge 584, BEHRINGWERKE AG) zur Verfügung. Als Lösungs- und Elutionsmittel für die Gelfiltration wurde 0,02 M Phosphatpufferlösung nach SÖRENSEN pH 7,40 mit 0,9 % Natriumchlorid und 0,05 % Natriumthiosulfat verwendet (=Standardpuffer). Die Konzentrationen der untersuchten Substanzen lagen jeweils zwischen 10^{-5} M und 10^{-4} M. Die einzelnen Substanzen wurden zusammen mit Albumin in Standardpufferlösung aufgenommen.

Die Albuminkonzentration betrug immer 1 %. Der pH-Wert der Lösung wurde kontrolliert und wenn notwendig auf pH 7,40 mit 0,1 n Natronlauge (NaOH) oder 0,1 n Salzsäure (HCl) nachgestellt.

Auf eine Sephadex-G-50-fine-Säule von 20 cm Länge und 1,2 cm Durchmesser wurden 20 ml des Lösungsansatzes der jeweils zu bestimmenden Substanz gebracht und bei Raumtemperatur mit Standardpufferlösung als Elutionsmittel eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug etwa 24 ml/Stunde. Es wurden Fraktionen zu 3 ml aufgefangen.

Auf Grund der Photosensibilität der Substanzen wurden braune Chromatographierohre und braune Reagenzgläser verwendet.

Da die freie, nicht an Eiweiß gebundene Substanz durch das Eindringen in die Poren des Sephadexgel auf Grund der längeren Wegstrecke gebremst wird, erscheint zuerst die an Eiweiß gebundene Substanz im Eluat (=Eiweißzone). Die Bestimmung der freien Substanz erfolgte in der eiweißfreien Plateau-Zone zwischen 10. und 18. Fraktion (=30 bis 54 ml).

Bestimmung der Bestandteile

a) Farbtest

Zur quantitativen Bestimmung des Gehaltes an freier, ungebundener Substanz wurde jeweils 1 ml (bzw. 2 ml) der zu untersuchenden Fraktion mit 1 ml 1 N Natronlauge (bei 2-OH-PZ wurde NaOH weggelassen!) alkalisch gemacht und mit 10 ml. n-Heptan, das zusätzlich 1,5 Vol.% Isoamylalkohol enthielt, 30 Minuten maschinell geschüttelt. Nach 3-min. Zentrifugieren bei 0°C zur Trennung der Phasen wurden 5 ml der organischen Phase abpipettiert und mit 2 ml (bzw. 1 ml) "Eisen-Reagenz", bestehend aus 50%-iger Schwefelsäure mit 10 mg_{g⁻¹} Eisen-III-Chlorid, versetzt und daraufhin durch 5-min. Schütteln extrahiert. Nach Absaugen des farblosen organischen Überstandes wurde der entstandene rote Farbstoff im Photometer Elko III der Firma Zeiss mit den entsprechenden Filtern gemessen: Didesmethylpromazin, Promazinsulfoxid, Desmethylpromazinsulfoxid mit Filter S 49 E; Promazin-N-oxid, Chlorpromazin-N-oxid, Didesmethylchlorpromazin und Chlorpromazinsulfoxid mit Filter S 53 E; 2-Hydroxypromazin mit Filter S 55 E;.

Als Leerwert wurde ein Versuchsansatz mitgeführt, der anstelle der Substanzlösung Standardpufferlösung enthielt. Ein Probewert mit der Ausgangskonzentration der jeweiligen Substanz in 1 %-iger Albuminlösung wurde ebenfalls mitgeführt und nach der gleichen Methode aufgearbeitet.

b) UV-Test

Da bei einigen Substanzen in den niedrigen Konzentrationsbereichen (Desmethylpromazinsulfoxid und Promazin-N-oxid) die eben genannte Methode zur Bestimmung der freien Substanz nur eine sehr schwache Farbreaktion ergab, die auch nach Änderung der Volumina nicht so verstärkt werden konnte, daß die erzielten Ergebnisse auswertbar waren, wurde hier das eiweißfreie Eluat direkt im Photometer BECKMAN, Modell DB, durch UV-Absorption bestimmt. Zur Kontrolle des Farbtests wurde bei allen Substanzen bei einer Ausgangskonzentration von $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ das eiweißfreie Eluat im UV-Licht (Photometer BECKMAN, Modell DB) bei folgenden Absorptionsmaxima gemessen:

Promazin-N-oxid, Chlorpromazin-N-oxid, Didesmethylpromazin, Didesmethylchlorpromazin bei $\lambda = 250 \text{ m}\mu$; Desmethylpromazinsulfoxid und Promazinsulfoxid bei $\lambda = 270 \text{ m}\mu$; Chlorpromazinsulfoxid bei $\lambda = 245 \text{ m}\mu$ und 2-Hydroxypromazin bei $\lambda = 300 \text{ m}\mu$.

Berechnung des α -Wertes

Nach der Eiweißzone, in der die Substanz nahezu 100 % der Ausgangskonzentration erreicht, folgt die eiweißfreie Zone, in der die freie Substanzkonzentration in einem Plateau nahezu konstante Werte einnimmt (KRIEGLSTEIN und KUSCHINSKY, 1968). Aus den Extinktionen der Fraktionen dieses Plateaus wurde der Mittelwert errechnet und daraus der α -Wert (prozentualer Anteil an freier, nicht an Eiweiß gebundener Substanz) bestimmt, indem die Extinktion des mitgeführten Probewertes gleich 100 % gesetzt wurde. In Analogie zum α -Wert kann man den β -Wert berechnen als den prozentualen Anteil an gebundener Substanz ($\alpha + \beta = 100$).

Die Bestimmung des α -Wertes im UV-Test wurde mit Hilfe einer Eichkurve der jeweiligen Substanz erreicht. Es wurde für die zu untersuchende Substanz eine Eichkurve bei den oben genannten Absorptionsmaxima im UV-Licht angefertigt. Die durch den UV-Test gewonnen Plateauwerte wurden mit dem Extinktionswert der Ausgangskonzentration auf der Eichkurve verglichen und wie oben beschrieben berechnet.

Bestimmung des Verteilungskoeffizienten P

Es wurden n-octanolgesättigte Standardpufferlösung (ohne Natriumthiosulfat) und puffergesättigtes n-Octanol verwendet (nach HANSCH und Mitarb., 1962). Alle Substanzen wurden in einer Ausgangskonzentration von $10^{-4}M$ der octanolgesättigten Pufferlösung zugegeben. 25 ml der jeweiligen Substanz-Standardpufferlösung wurden zusammen mit 2 ml n-Octanol bei pH 7,40 eine Stunde maschinell geschüttelt. Nach 5-minütiger Zentrifugation und nachfolgendem Absaugen der organischen Phase wurde wieder 3 Minuten zentrifugiert und darauf die Substanzkonzentration in der wäßrigen Phase durch Messung im UV-Licht bei den entsprechenden Wellenlängen (s.o.) bestimmt. Die Konzentration in der organischen Phase wurde durch die Differenz von Ausgangskonzentration und Konzentration in der wäßrigen Phase bestimmt. Der Quotient aus der Konzentration in der organischen Phase C_o und der Konzentration in der wäßrigen Phase c_w ergab den Verteilungskoeffizienten $P = \frac{C_o}{c_w}$. Die unterschiedlichen Volumina von organischer und wäßriger Phase wurden bei der Berechnung berücksichtigt.

Die Größen zur Bestimmung und Charakterisierung der Eiweißbindung sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt (s.Tab. 1)

Tabelle 1: Charakteristische Größen zur Bestimmung der Eiweiß-
bindung von Arzneimitteln.

Bezeichnung	Symbol	Maßeinheit	Bestimmung
Gesamtkonzentration der Metaboliten	c	$10^{-5}M$	Einwaage
Konzentration an freier Substanz	c_f	$10^{-5}M$	Analyse
Konzentration an gebundener Substanz	c_g	$10^{-5}M$	$c_g = c - c_f$
Albumingeesamt-konzentration	c_p	g% bzw. $10^{-5} M$	Einwaage
Prozentualer Anteil an freier Substanz	α	%	Analyse
Prozentualer Anteil an gebundener Substanz	β	%	$\beta = 100 - \alpha$
Spezifisches Bindungsvermögen	$\bar{r}$	$\frac{M}{M}$	$\bar{r} = \frac{c_g}{c_p}$
Steigungskonstante	m	-	$\log c_g = \log k^+ + m \cdot \log c_f$ (SCHOLTAN, 1962) s. Abb. 3
Apparente Bindungskonstante	k^+	$(10^{-5}M)^{1-m}$	$k^+ = \frac{c_g}{c_f^m}$ oder $\log k^+ = \log c_g - m \log c_f$
Gesamtbindungskonstante	K_1	$10^4 \cdot M^{-1}$	nach SCATCHARD (1949)
Freie Reaktionsenergie	ΔF^0	cal/M	$\Delta F^0 = -RT \ln K_1$
Absolute Temperatur	T	°K	Messung
Verteilungskoeffizient	P	-	Analyse

Statistik

Mit Hilfe einer zweifachen Varianzanalyse ließ sich prüfen, ob sich bei den einzelnen Substanzen (Einflußgröße 1) und den verschiedenen Konzentrationen (Einflußgröße 2) nachweisbare Unterschiede zeigten.

Die Ergebnisse der Varianzanalyse sind in Tabelle 13 dargestellt. Die mit der Varianzanalyse nur pauschal nachgewiesenen Mittelwertsdifferenzen wurden mit Hilfe des TUKEY-Test's lokalisiert, der es gestattet, alle paarweisen Mittelwertsdifferenzen simultan zu untersuchen (Tab. 2).

Ergebnisse

Der prozentuale Anteil α bzw. β an freier bzw. gebundener Substanz und seine Abhängigkeit von der Konzentration (s. Abb. 1)

Die errechneten F-Werte (Tab. 13) überschreiten den entsprechenden Tabellenwert bei einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % erheblich. Es liegen also signifikante Unterschiede vor, das heißt, daß mit steigender Konzentration in dem hier untersuchten Bereich von 10^{-5} bis $10^{-4}M$ die α -Werte ansteigen bzw. die Eiweißbindung abnimmt und daß sich auch die α -Werte der untersuchten Substanzen pauschal unterscheiden. Die Ergebnisse der Mittelwertsvergleiche des TUKEY-Test's sind in der folgenden "Differenzenmatrix" dargestellt:

Tabelle 2: Differenzenmatrix zur Darstellung der Ergebnisse der Mittelwertvergleiche des TUKEY-Test's.
Bei Überschreitung der Grenzwerte T der Mittelwertsdifferenzen läßt sich ein Unterschied statistisch sichern: $T_{5\%} = \pm 5,33$ (* = auffällig verschieden); $T_{1\%} = \pm 6,30$ (** = signifikant verschieden).

Substanz	DPZ-SO	2-OH-PZ	PZ-SO	DDPZ	CPZ-NO	DDCPZ	CPZ-SO	PZ-NO
DPZ-SO	-							
2-OH-PZ	48,38**	-						
PZ-SO	-7,19**	-55,57**	-					
DDPZ	42,73**	- 5,65*	49,92**	-				
CPZ-NO	33,55**	-14,83**	40,74**	-9,18**	-			
DDCPZ	58,85**	10 ,47**	66,04**	16,12**	25,30**	-		
CPZ-SO	-3,37	-51,75**	3,82	-46,10**	-36,92**	-62,22**	-	
PZ-NO	20,78**	-27,60**	27,97**	-21,95**	-12,77**	-38,07**	24,15**	-

Zwischen der Eiweißbindung von Desmethylpromazinsulfoxid und Chlorpromazinsulfoxid besteht ebensowenig ein sicherer Unterschied, wie zwischen Chlorpromazinsulfoxid und Promazinsulfoxid. Für Promazinsulfoxid besteht auch kein sicherer Unterschied zu $\alpha = 100 \%$. Eine Bindung von Promazinsulfoxid in der Albuminlösung ist damit nicht nachweisbar. Didesmethylchlorpromazin (mit einem β -Wert von 65 (für $c = 10^{-4}M$) als Metabolit des Chlorpromazin und 2-Hydroxypromazin ($\beta = 53$) sowie Didesmethylpromazin ($\beta = 46$) als Metabolit des Promazin zeigen die stärkste Affinität zum Albumin. In ihrer Affinität zum Albumin folgen die beiden N-Oxide (CPZ-NO, $\beta = 40$; PZ-NO, $\beta = 22$), das Desmethylpromazinsulfoxid ($\beta = 7$) und Chlorpromazinsulfoxid (CPZ-SO, $\beta = 3$), das nur noch eine geringe Affinität zum Protein zeigt (Tab. 4).

Für Promazin fanden KRIEGLSTEIN und KUSCHINSKY (1969) einen β -Wert von 49 %, für Chlorpromazin $\beta = 70 \%$. Es fällt auf, daß durch Didemethylierung keine gesicherte Abnahme der Albuminbindung erfolgt. Dagegen nimmt die Eiweißbindung der N-Oxide des Promazin und Chlorpromazin deutlich ab.

Chlorpromazinsulfoxid scheint noch eine geringe Affinität zum Albumin zu besitzen, was bei Promazinsulfoxid nicht nachweisbar ist. Das Sulfoxid des Desmethylderivates des Promazin hat die stärkste Affinität aller untersuchten Sulfoxide zum Albuminmolekül, was mit einer verstärkten ionogenen Bindung des demethylierten Stickstoffs in der Seitenkette erklärt werden könnte (vergl. GLASSER und KRIEGLSTEIN, 1970). Der B -Wert des in Stellung 2 des Benzolringes mit einer Hydroxy-Gruppe substituierten Promazin (2-OH-PZ) ist um ca. 5 % größer, als der des Promazin (Tab. 4).

Gesamtbindungskonstante K_1

Die Darstellung der Versuchsergebnisse nach SCATCHARD (1949) in Abb. 2 ergibt für die Didesmethylderivate des Promazin und Chlorpromazin, für 2-Hydroxypromazin, Chlorpromazin-N-oxid und Promazin-N-oxid gerade Linien. Für Desmethylpromazinsulfoxid ergibt die Darstellung eine gekrümmte Linie. Auf Grund der geringen Albuminbindung von Chlorpromazinsulfoxid und der nicht nachweisbaren Albuminbindung von Promazinsulfoxid wurden beide Substanzen nicht dargestellt.

Die Geraden sprechen für bindende Gruppen gleicher Affinität, die gekrümmten Linien für Bindungskräfte unterschiedlicher Affinität. Die Gesamtbindungskonstante K_1 ergibt sich als Ordinatenschnittpunkt (Tab. 3). Außerdem kann mit Hilfe dieser Darstellung die Anzahl n der Bindungsstellen pro Albuminmolekül als Schnittpunkt mit der Abszisse erhalten werden.

Freie Reaktionsenergie ΔF^0 :

Aus der Gesamtbindungskonstanten K_1 kann die freie Reaktionsenergie ΔF^0 nach der Gleichung

$$\Delta F^0 = - RT \ln K_1$$

berechnet werden (Tab. 3).

Apparente Bindungskonstante k^+ :

Die in Abb. 3 abgebildeten Bindungsgeraden gehorchen in dem untersuchten Konzentrationsbereich folgenden Gleichungen, die aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitet sind (SCHOLTAN, 1962):

$$\text{I} \quad \log c_g = \log k^+ + m \log c_f \quad \text{oder}$$

$$\text{II} \quad c_g = k^+ \cdot c_f^m$$

Die Steigungskonstante m ergibt sich aus den in Abb. 3 dargestellten Regressionsgeraden als Regressionskoeffizient. Die apparente Bindungskonstante k^+ kann aus obenstehenden Gleichungen berechnet werden. Durch sie wird die Bindungsfähigkeit der Metaboliten in dem jeweils untersuchten Konzentrationsbereich bestimmt. Die Gleichung $\log c_g = \log k^+ + m \cdot \log c_f$ vereinfacht sich auf " $\log c_g = \log k^+$ ", wenn $c_f = 10^{-5}M$ beträgt. Für die Konzentration $c_f = 10^{-5}M$ kann k^+ als Ordinatenabschnitt erhalten werden. Die Steigungskonstante m aller dargestellten Geraden ist kleiner als 1, was auf Einzelbindungskonstanten verschiedener Größenordnung zurückzuführen ist. k^+ ist bei den Chlorpromazinderivaten größer als bei den entsprechenden Promazinderivaten (Tab. 3).

Verteilungskoeffizient P

Durch die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten P zwischen n -Octanol und Standardpufferlösung bei pH 7,40 (HANSCH und Mitarb., 1962) sollte die Hydrophobie der Metaboliten charakterisiert werden. Der höchste Verteilungskoeffizient der Chlorpromazinmetaboliten

wurde für Chlorpromazin-N-oxid erhalten. P nimmt in der Reihenfolge Chlorpromazin-N-oxid-Didesmethylchlorpromazin-Chlorpromazinsulfoxid ab (Tab. 4).

Ähnlich ist es bei den Promazinmetaboliten. Auch hier hat das N-oxid den höchsten Verteilungskoeffizienten, jedoch liegt in der Reihenfolge der Abnahme von P zwischen Promazin-N-oxid und Didesmethylpromazin noch 2-Hydroxypromazin. Es folgen Promazinsulfoxid und Desmethylpromazinsulfoxid (Tab. 4). Insgesamt sind die Chlorpromazinmetaboliten hydrophober als die Promazinmetaboliten, was auch in den Verteilungskoeffizienten von Promazin ($P = 357 \pm 16$) und Chlorpromazin ($P = 1814 \pm 107$) (KRIEGLSTEIN, 1970) zum Ausdruck kommt (P-Werte angegeben als $\bar{x} \pm S \bar{x}$).

Alle untersuchten Metaboliten sind in hohem Maße hydrophiler als ihre Ausgangssubstanzen Promazin und Chlorpromazin.

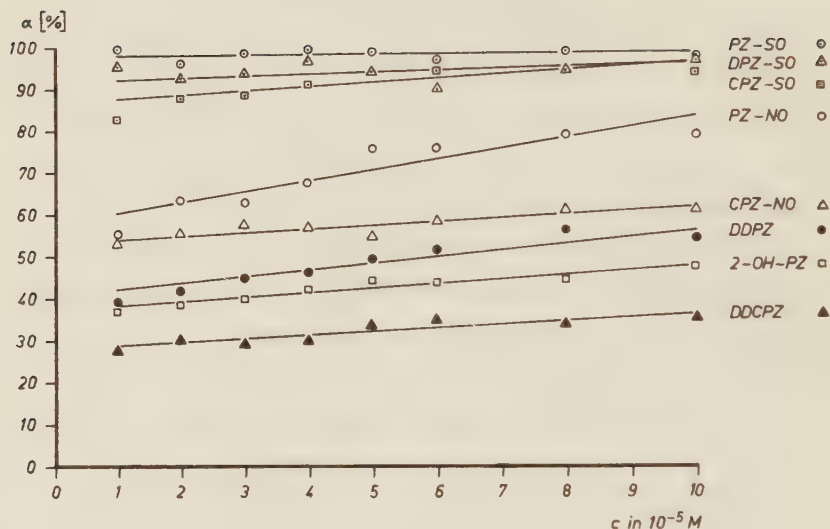


Abb. 1

Bindungsvermögen der 1 %-igen Rinderserumalbuminlösung für die angegebenen Metaboliten. Der prozentuale Anteil α an freier Substanz (in %, Ordinate) in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration c (in $10^{-5}M$, Abszisse). Die Punkte auf den Kurven stellen Mittelwerte aus jeweils 2 Einzelbestimmungen dar (Tab. 5 - 12).

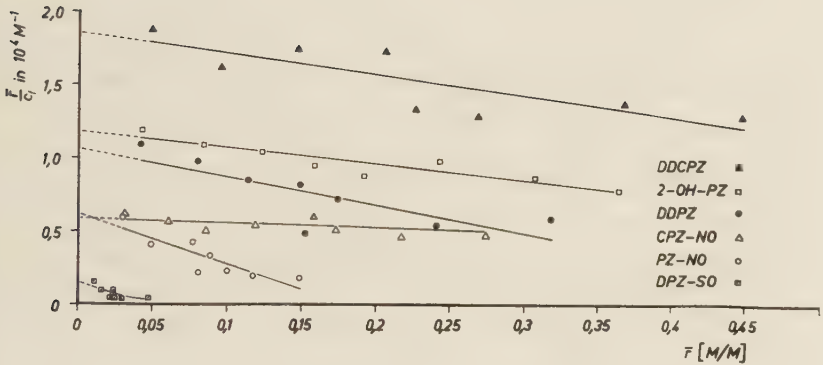


Abb. 2:

Bindungsvermögen der 1 %-igen Rinderserumalbuminlösung für die jeweiligen Metaboliten. Abhängigkeit des Quotienten $\frac{\bar{r}}{c_f}$ (in $10^4 \cdot M^{-1}$, Ordinate) von dem spezifischen Bindungsvermögen $\bar{r}$ (in M/M, Abszisse) nach SCATCHARD (1949). Die Geraden stellen Regressionsgeraden dar. An die Werte der gekrümmten Linie von DPZ-SO wurde ein Polynom nach dem Verfahren von TSCHEBYSCHEFF angepaßt ($y = a_0 + a_1 x + a_2 x^2$). Die Punkte der Kurven stellen Mittelwerte aus jeweils 2

Einzelbestimmungen dar (Tab. 5 - 12). Die Gleichungen der Regressionsgeraden sind (r = Korrelationskoeffizient):

2-Hydroxypromazin	: $\bar{r}/c_f = 1,176-1,082 \cdot \bar{r}$; $r = 0,9021$
Chlorpromazin-N-oxid	: $\bar{r}/c_f = 0,599-0,479 \cdot \bar{r}$; $r = 0,6899$
Didesmethylchlorpromazin	: $\bar{r}/c_f = 1,855-1,415 \cdot \bar{r}$; $r = 0,7833$
Didesmethylpromazin	: $\bar{r}/c_f = 1,066-1,932 \cdot \bar{r}$; $r = 0,7859$
Promazin-N-oxid	: $\bar{r}/c_f = 0,621-3,405 \cdot \bar{r}$; $r = 0,8528$

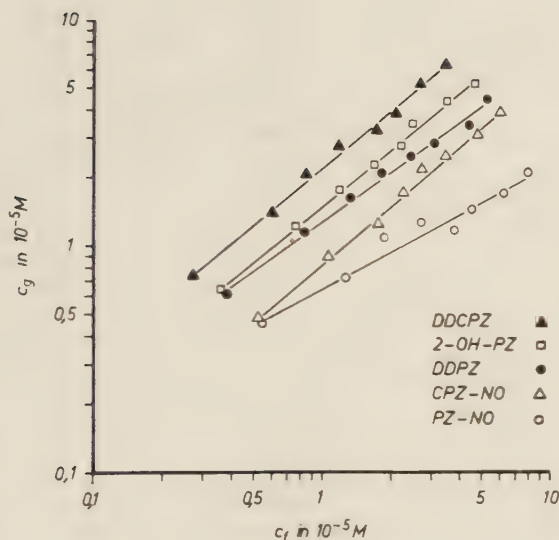


Abb. 3:

Der Einfluß der Metaboliten des Promazin und Chlorpromazin auf das Bindungsvermögen einer 1 %-igen Rinder-serumalbuminlösung. Abhängigkeit der Konzentration c_g an gebundener Substanz (in $10^{-5}M$, Ordinate) von der Konzentration c_f an freier Substanz (in $10^{-5}M$, Abszisse) nach SCHOLTAN (1962). Die Geraden stellen Regressionsgeraden dar, deren Gleichungen für die einzelnen Substanzen sind (r = Korrelationskoeffizient):

Chlorpromazin-N-oxid	: $\log c_g = -0,0832 + 0,8809 \cdot \log c_f$; $r = 0,9962$
Didesmethylchlorpromazin	: $\log c_g = 0,3508 + 0,8470 \cdot \log c_f$; $r = 0,9970$
Didesmethylpromazin	: $\log c_g = 0,1133 + 0,7262 \cdot \log c_f$; $r = 0,9952$
2-Hydroxypromazin	: $\log c_g = 0,1778 + 0,8428 \cdot \log c_f$; $r = 0,9976$
Promazin-N-oxid	: $\log c_g = -0,1833 + 0,5472 \cdot \log c_f$; $r = 0,9736$

Tabelle 3: Charakteristische Größen der Albuminbindung der Phenothiazinmetaboliten. Der Einfluß der molekularen Struktur auf die Gesamtbindingkonstante K_1 , die freie Reaktionsenergie ΔF^0 , die apparente Bindungskonstante k^+ und die Steigungskonstante m .

Metaboliten	$K_1 \cdot 10^{-4}$ (M^{-1})	ΔF^0 (cal/Mol)	k^+ ($(10^{-5}M)^{1-m}$)	m
Didesmethylchlorpromazin	1,86	-5769	2,24	0,847
2-Hydroxypropromazin	1,18	-5500	1,50	0,843
Didesmethylpromazin	1,07	-5441	1,30	0,726
Chlorpromazin-N-oxid	0,59	-5089	0,83	0,881
Promazin-N-oxid	0,62	-5119	0,64	0,547

Tabelle 4: Der Einfluß der molekularen Struktur auf den prozentualen Anteil B an gebundener Substanz und den Verteilungskoeffizienten P. Die Verteilungskoeffizienten sind angegeben als Mittelwerte ($\bar{x}$) aus 6 Einzelbestimmungen mit den Standardabweichungen des Mittelwertes ($s \bar{x}$).

Metaboliten	B (%) für $c = 10^{-4} M$	P $\bar{x}$ $s \bar{x}$
Didesmethylchlorpromazin	65	110 $\pm$ 6,9
2-Hydroxypropazin	53	73 $\pm$ 10,7
Didesmethylpromazin	46	29 $\pm$ 0,8
Chlorpromazin-N-oxid	40	132 $\pm$ 6,0
Promazin-N-oxid	22	80 $\pm$ 3,1
Desmethylpromazinsulf-oxid	7	0,53 $\pm$ 0,07
Chlorpromazinsulfoxid	3	6,14 $\pm$ 0,34
Promazinsulfoxid	3	1,38 $\pm$ 0,9

Tabelle 5: Bindungsvermögen einer 1 %-igen Rinderserumalbuminlösung für Desmethylpromazin-sulfoxid. Angegeben sind α , c_f , c_g , $\log c_f$, $\log c_g$, $\bar{\alpha}$, $\bar{c}_f$, $\bar{c}_g$ (Definition s. Tab. 1) in Abhängigkeit von der Desmethylpromazin-sulfoxid-gesamtkon- c_f -zentration c. Es werden Mittelwerte an- gegeben, die aus einem im UV-Test und einem im Farbtest gemessenen Wert (s. Methodik) be- stehen.

$c(10^{-5}M)$	$\alpha(\%)$	$c_f(10^{-5}M)$	$c_g(10^{-5}M)$	$\bar{\alpha}(\frac{M}{M})$	$\frac{\bar{c}_f}{c_f}(10^5 \cdot M^{-1})$	$\log c_f(10^{-5}M)$	$\log c_g(10^{-5}M)$
1	82,72	0,8272	0,1727	0,0119	0,01505	-0,0840	-0,8050
2	87,73	1,7547	0,2453	0,0169	0,00983	0,2437	-0,6383
3	88,07	2,6421	0,3579	0,0247	0,00970	0,4210	-0,5028
4	90,85	3,6840	0,3660	0,0253	0,00685	0,5603	-0,4437
5	93,45	4,6725	0,3275	0,0226	0,00489	0,6693	-0,5205
6	93,75	5,6250	0,3750	0,0259	0,00467	0,7499	-0,4807
8	94,50	7,5600	0,4400	0,0304	0,00402	0,8785	-0,3583
10	93,00	9,3000	0,7000	0,0483	0,00520	0,9684	-0,5954
Kontrollwert durch Messung im UV-Test:							
5	94,00	4,7000	0,3000	0,0207	0,00444	0,6719	-0,5484

Tabelle 6: Bindungsvermögen einer 1 %-igen Rindereserumalbuminlösung für 2-Hydroxypromazin.
 Angegeben sind α , c_f , c_g , $\log c_f$, $\log c_g$, $\bar{r}$, $\frac{\bar{r}}{c_f}$, (Definition s. Tab. 1) in Abhängigkeit von der 2-Hydroxypromazingesamtkonzentration c . Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

$c (10^{-5}M)$	$\alpha(\%)$	$c_f (10^{-5}M)$	$c_g (10^{-5}M)$	$\bar{r}(\frac{M}{M})$	$\frac{\bar{r}}{c_f} (10^5 \cdot M^{-1})$	$\log c_f (10^{-5}M)$	$\log c_g (10^{-5}M)$
1	36,60	0,3660	0,6340	0,0437	0,11905	-0,4366	-0,1979
2	38,97	0,7795	1,2205	0,0842	0,10804	-0,1082	0,0865
3	39,98	1,1994	1,8006	0,1242	0,10401	0,0784	0,2551
4	42,22	1,6896	2,3104	0,1594	0,09440	0,2277	0,3636
5	44,25	2,2127	2,7872	0,1923	0,08704	0,3447	0,4450
6	43,50	2,4700	3,5300	0,2436	0,09879	0,3924	0,5476
8	44,24	3,5372	4,4628	0,3080	0,08714	0,5485	0,6495
10	47,15	4,7150	5,2850	0,3647	0,07788	0,6727	0,7224
Kontrollwert durch Messung im UV-Test:							
5	50,00	2,5000	2,5000	0,1725	0,06900	0,3979	0,3979

Tabelle 7: Bindungsvermögen einer 1 %-igen Rinderserumalbuminlösung für Promazin-sulfoxid. Angegeben sind α , c_f , c_g , $\bar{r}$, $\bar{r}_M$, $\bar{r}_f$ (Definition siehe Tab. 1) in Abhängigkeit von der Promazin-sulfoxidgesamt-kon-
zentrati-on c. Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

$c(10^{-5}M)$	$\alpha(\%)$	$c_f(10^{-5}M)$	$c_g(10^{-5}M)$	$\bar{r}_M$	$\frac{\bar{r}_f}{c_f}(10^5 \cdot M^{-1})$
1	99,14	0,9914	0,0086	0,0006	0,00060
2	95,98	1,9197	0,0803	0,0055	0,00290
3	98,30	2,9491	0,0508	0,0035	0,00120
4	99,00	3,9602	0,0398	0,0027	0,00070
5	98,38	4,9190	0,0810	0,0059	0,00121
6	96,10	5,7660	0,2340	0,0161	0,00283
8	98,05	7,8440	0,1560	0,0108	0,00138
10	96,60	9,6600	0,3400	0,0235	0,00249
Kontrollwert durch Messung im UV-Test:					
5	99,50	4,9750	0,0250	0,0017	0,00035

Tabelle 8: Bindungsvermögen einer 1 %-igen Hindereserumalbuminlösung für Didesmethylpromazin.

Angegeben sind α , c_f , c_g , $\log c_f$, $\log c_g$, $\bar{r}$, $\bar{r}_M$ (Definition siehe Tab. 1) in Abhängigkeit von der Didesmethylpromazingesamtkonzentration c . Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

$c(10^{-5}M)$	$\alpha(\%)$	$c_f(10^{-5}M)$	$c_g(10^{-5}M)$	$\bar{r}_M$	$\frac{\bar{r}}{c_f}(10^5 \cdot M^{-1})$	$\log c_f(10^{-5}M)$	$\log c_g(10^{-5}M)$
1	38,60	0,3860	0,6140	0,0424	0,10979	-0,4134	-0,2118
2	41,50	0,8300	1,1700	0,0807	0,09791	-0,0817	0,0677
3	44,90	1,3470	1,6530	0,1141	0,08469	0,1293	0,2182
4	45,70	1,8280	2,1720	0,1499	0,08199	0,2620	0,3369
5	49,45	2,4730	2,5270	0,1744	0,07114	0,3922	0,4016
6	51,98	3,1188	2,8812	0,1528	0,04853	0,4929	0,4584
8	56,30	4,5040	3,4960	0,2412	0,05356	0,6536	0,5436
10	53,79	5,3795	4,6205	0,3188	0,05936	0,7305	0,6644
Kontrollwert durch Messung im UV-Test:							
5	43,50	2,1750	2,8250	0,1949	0,08964	0,3374	0,4510

Tabelle 9: Bindungsvermögen einer 1 %-igen Rinderserumalbuminlösung für Chlorpromazin-N-oxid.

Angegeben sind α , c_f , c_g , $\log c_f$, $\log c_g$, $\bar{\alpha}$, $\bar{c}_f$ (Definition siehe Tab. 1) in Abhängigkeit von der Chlorpromazin-N-oxidgesamtkonzentration c. Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

$c(10^{-5}M)$	$\alpha(\%)$	$c_f(10^{-5}M)$	$c_g(10^{-5}M)$	$\bar{\alpha}(\frac{M}{M})$	$\frac{\bar{c}_f}{c_f}(10^5 \cdot M^{-1})$	$\log c_f(10^{-5}M)$	$\log c_g(10^{-5}M)$
1	52,85	0,5285	0,4715	0,0325	0,06159	-0,2770	-0,3266
2	55,55	1,1110	0,8890	0,0613	0,05588	0,0445	-0,0529
3	57,52	1,7457	1,2542	0,0865	0,04970	0,2417	0,0979
4	56,75	2,2700	1,7300	0,1194	0,05330	0,3547	0,2358
5	54,15	2,7075	2,2925	0,1582	0,06026	0,4294	0,3560
6	57,80	3,4680	2,5320	0,1747	0,05110	0,5387	0,4010
8	60,65	4,8484	3,1480	0,2172	0,04596	0,6834	0,4928
10	60,32	6,0325	3,9675	0,2738	0,04729	0,7769	0,5901
Kontrollwert durch Messung im UV-Test:							
5	51,10	2,5550	2,4450	0,1687	0,06603	0,4073	0,3882

Tabelle 10: Bindungsvermögen einer 1 %-igen Rinder Serumalbuminlösung für Didesmethylchlorpromazin. Angegeben sind α , c_f , c_g , $\log c_f$, $\log c_g$, $\bar{\alpha}$, $\bar{c}_f$ (Definition siehe Tab. 1) in Abhängigkeit von der Didesmethylchlorpromazinsgesamt- c_f -konzentration o. Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

$c(10^{-5}M)$	$\alpha(\%)$	$c_f(10^{-5}M)$	$c_g(10^{-5}M)$	$\bar{\alpha}(\frac{M}{M})$	$\bar{c}_f(10^5 \cdot M^{-1})$	$\log c_f(10^{-5}M)$	$\log c_g(10^{-5}M)$
1	27,23	0,2723	0,7277	0,0502	0,18822	-0,5682	-0,1385
2	30,39	0,6079	1,3921	0,0961	0,16104	-0,2190	0,1431
3	23,25	0,8475	2,1525	0,1485	0,17598	-0,0725	0,3328
4	29,79	1,1918	2,8082	0,2069	0,17416	0,9760	0,4484
5	34,27	1,7137	3,2862	0,2268	0,13240	0,2338	0,5167
6	35,11	2,1066	3,8934	0,2686	0,12754	0,3235	0,5903
8	33,28	2,6596	5,3404	0,3685	0,13857	0,4248	0,7276
10	34,95	3,4950	6,5050	0,4488	0,12948	0,5422	0,8129
Kontrollwert durch Messung im UV-Test:							
5	27,50	1,3750	3,6250	0,25012	0,18199	0,1382	0,5593

Tabelle 11: Bindungsvermögen einer 1 %-igen Rinderserumalbuminlösung für Chlorpromazinsulfoxid.

Angegeben sind α , c_f , c_g , $\log c_f$, $\log c_g$, $\bar{r}$, $\bar{r}_f$ (Definition siehe Tab. 1) in Abhängigkeit von der Chlorpromazinsulfoxidge- c_f -samtkonzentration c . Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

$c(10^{-5}M)$	$\alpha(\%)$	$c_f(10^{-5}M)$	$c_g(10^{-5}M)$	$\bar{r}(\frac{M}{M})$	$\frac{\bar{r}}{c_f}(10^5 \cdot M^{-1})$	$\log c_f(10^{-5}M)$	$\log c_g(10^{-5}M)$
1	95,08	0,9508	0,0491	0,0034	0,00385	-0,0219	-1,3272
2	92,37	1,8474	0,1526	0,0105	0,00580	0,2662	-0,8636
3	93,92	2,8176	0,1824	0,0126	0,00447	0,4499	-0,7426
4	96,94	3,8776	0,1224	0,0111	0,00288	0,5884	-1,0398
5	93,63	4,6817	0,3182	0,0219	0,00469	0,6704	-0,4986
6	89,30	5,3580	0,6420	0,0443	0,00841	0,7286	-0,2234
8	93,15	7,4520	0,5480	0,0377	0,00506	0,8723	-0,2621
10	96,69	9,6690	0,3310	0,2282	0,00238	0,9853	-0,5203
Kontrollwert durch Messung im UV-Test:							
5	93,00	4,6500	0,3500	0,0242	0,00520	0,6674	-0,4604

Tabelle 12: Bindungsvermögen einer 1 %-igen Rinder Serumalbuminlösung für Promazin-N-oxid. Angegeben sind α , c_f , c_g , $\log c_f$, $\log c_g$, $\bar{r}$, $\bar{r}_M$ (Definition siehe Tab. 1) in Abhängigkeit der Promazin-N-oxidgesamtkon- c_f -zentration c. Die Werte der Konzentration $1 \cdot 10^{-5} M$ bis einschließlich $4 \cdot 10^{-5} M$ sind durch Messung der UV-Absorption des Eluats erhalten worden. Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

$c(10^{-5} M)$	$\alpha(\%)$	$c_f(10^{-5} M)$	$c_g(10^{-5} M)$	$\bar{r}_M$	$\frac{\bar{r}}{c_f}(10^5 \cdot M^{-1})$	$\log c_f(10^{-5} M)$	$\log c_g(10^{-5} M)$
1	55,00	0,5500	0,4500	0,0311	0,06074	-0,2669	-0,3577
2	63,75	1,2750	0,7250	0,0500	0,04029	0,1034	-0,1462
3	62,50	1,8750	1,1250	0,0776	0,04301	0,2698	0,0422
4	67,50	2,7000	1,3000	0,0897	0,03336	0,4311	0,1126
5	76,14	3,8225	1,1775	0,0812	0,02145	0,5819	0,0659
6	75,60	4,5390	1,4610	0,1008	0,02230	0,6567	0,1626
8	78,60	6,2880	1,7120	0,1181	0,01920	0,7975	0,2192
10	78,35	7,8350	2,1650	0,1494	0,01917	0,8938	0,3322
Kontrollwert durch Messung im UV-Test:							
5	77,00	3,8500	1,1500	0,0794	0,02075	0,5851	0,0570

Tabelle 13: Varianzanalysentabelle

Beteiligte Ein- flußgrößen	Anzahl der Freiheitsgrade	Summe der Abwei- chungsquadrate	Mittleres Abw. Quadrat	F	Signifikanz
1 Substanzen	7	72945,56055	10420,79436	426	$P < 0,01$
2 Konzentration	7	1203,09805	171,87115	7,46	$P < 0,01$
1/2	49	1158,23008	23,63735	1,03	n.s.
Wiederholung	64	1472,23500	23,01461		
Total	127	76779,82367			

Diskussion

1. Charakterisierung der Eiweißbindung der Metaboliten des Promazin und Chlorpromazin.

Die Charakterisierung der Eiweißbindung durch α -Wert und Ausgangskonzentration (Abb. 1) ist unzureichend. Näheren Aufschluß geben die auf dem Massenwirkungsgesetz beruhenden Darstellungsverfahren nach SCATCHARD (Abb. 2) und SCHOLTAN (Abb. 3). Die Darstellung nach SCATCHARD ergibt die Gesamtbindungskonstante K_1 und die Anzahl der Bindungsstellen n am Albuminmolekül, während die Darstellung nach SCHOLTAN die Steigungskonstante m und die apparente Bindungskonstante k^+ ergibt.

Die Gesamtbindungskonstante K_1 ist wichtig für energetische Betrachtungen, die apparente Bindungskonstante k^+ gibt Aufschluß über die Bindungsfähigkeit der untersuchten Substanzen in dem jeweils untersuchten Konzentrationsbereich, und die Steigungskonstante m gibt an, in welchem Maße sich die aufeinander folgenden Einzelbindungskonstanten unterscheiden.

Die apparente Bindungskonstante k^+ ist bei den Chlorpromazinderivaten größer als bei den entsprechenden Promazinderivaten. Dies stimmt mit Ergebnissen früherer Untersuchungen von Chlorpromazin und Promazin (KRIEGLSTEIN und KUSCHINSKY, 1969) überein.

2. Der Einfluß der verschiedenen Substituenten der Phenothiazinmetaboliten auf die Eiweißbindung und den Verteilungskoeffizienten.

Mehr fett-, als wasserlösliche Arzneimittel können ohne weitere Metabolisierung den Organismus nicht mehr verlassen. Die Metabolisierung erfolgt durch meist oxydative Reaktionen, die die fettlöslichen Pharmaka wasserlöslicher und damit ausscheidungsfähig machen (GREIM, 1970). Auch die hier untersuchten Metaboliten sind wesentlich hydrophiler als ihre Ausgangssubstanzen Promazin und Chlorpromazin (siehe Tab. 4)

Die Phenothiazine sind vornehmlich durch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Albuminmolekül verbunden; andere Bindungsmechanismen treten in den Hintergrund, sind aber nicht ausgeschlossen (JÄHNCHEN, KRIEGLSTEIN und KUSCHINSKY, 1969). Es wäre also zu erwarten, daß die

Metaboliten auf Grund ihres hydrophileren Charakters schwächer als ihre Ausgangssubstanzen an das Serumalbumin gebunden sind. Die untersuchten Substanzen zeigen aber ein zum Teil genau gegenteiliges Verhalten. Zum Beispiel ist die Serumalbuminbindung des in Stellung 2 des Benzolringes OH-substituierten Promazinmetaboliten 2-Hydroxypromazin um etwa 5 % höher als die des Promazin; gleichzeitig ist aber eine Abnahme des Verteilungskoeffizienten um den 5. Teil zu verzeichnen.

Folgende Erklärungen bieten sich für die Änderung der Eiweißbindung durch Substitution in Stellung 2 des Phenothiazinmoleküls an (KRIEGLSTEIN und KUSCHINSKY, 1969):

1. Infolge der Substitution ändert sich der Dissoziationsgrad des Phenothiazinmoleküls und damit die ionogenen Kräfte der Albuminbindung.
2. Die Substituenten beteiligen sich direkt an der hydrophoben Bindung mit dem Albuminmolekül.

3. Nach JARDETZKY (1967) werden in Sulfonamid- bzw. Penicillinmolekül nur die aromatischen Ringe hydrophob gebunden. Die Substitution im Benzolring beeinflusst dessen Affinität zu den Bindungsstellen am Albuminmolekül.

Eine Zunahme der Eiweißbindung mit gleichzeitiger Abnahme des Verteilungskoeffizienten ist schon für Phenothiazinderivate beschrieben worden. Z.B. fanden KRIEGLSTEIN und KUSCHINSKY (1969) bei Substitutionen mit einer Methoxygruppe in Stellung 2 des Benzolringes eine deutliche Zunahme der Eiweißbindung, trotz gleichzeitiger Abnahme des Verteilungskoeffizienten. Anscheinend sind Eiweißbindung und Hydrophobie nur in bezug auf die hydrophoben Wechselwirkungen korreliert. Vermutlich drängt die Hydroxylsubstitution in Stellung 2 des Benzolringes die hydrophoben Bindungsmechanismen zurück, verstärkt aber gleichzeitig andere Wechselwirkungen mit dem Albuminmolekül. Dies weist vor allem auf ionogene Bindungsmechanismen hin, die durch die Hydroxylierung in verstärktem Maße auftreten. Aber auch Wasserstoffbrückenbindungen sind nicht auszuschließen, zu denen die OH-Gruppe befähigt ist.

Bei den Sulfoxiden des Promazin und Chlorpromazin, Promazinsulfoxid und Chlorpromazinsulfoxid, bewirkt anscheinend die Abnahme des Verteilungskoeffizienten eine gleichzeitige Abnahme der Bindung an Albumin. Beide Sulfoxide sind ungefähr 350 mal hydrophiler, als ihre Ausgangssubstanzen. Die Albuminbindung ist ebenfalls stark vermindert, das Promazinsulfoxid kann als ungebunden angesehen werden (Abb. 1). Beide Sulfoxide entsprechen in ihrem Verhalten bezüglich Eiweißbindung und Hydrophobie ganz der Auffassung einer vorwiegend hydrophoben Bindungsart zwischen Protein und Pharmakon.

Das Sulfoxid des am basischen Stickstoff der Seitenkette demethylierten Promazinmetaboliten, Desmethylpromazinsulfoxid, ist dagegen stärker gebunden, obwohl der Verteilungskoeffizient noch mehr abgenommen hat als beim Promazinsulfoxid.

Es konnte für verschiedene Arzneimittel gezeigt werden, daß mit jedem weiteren Kohlenstoffatom im Molekül die Eiweißbindung zunimmt (SCHOLTAN, 1964; HOFMANN u. Mitarb., 1970). Insbesondere nach Methylierung der

Monomethylamino-Gruppe wäre eine Verstärkung der Eiweißbindung zu erwarten (SCHOLTAN, 1964). Demethylierung bewirkt aber nach unseren Versuchsergebnissen eine geringe Zunahme der Affinität zum Albumin, und zwar nimmt mit der Anzahl der Demethylierungen anscheinend die Affinität zum Eiweiß zu. Auch bei den Didesmethylderivaten sind Eiweißbindung und Verteilungskoeffizient nicht korreliert. Es ist anzunehmen, daß durch die Demethylierung der Seitenkette in Stellung 10 ionogene Bindungsmechanismen in den Vordergrund rücken und die hydrophoben Wechselbeziehungen zurückdrängen. Die Ergebnisse früherer Untersuchungen der Eiweißbindung von Monodesmethylderivaten des Promazin und Chlorpromazin (KRIEGLSTEIN, 1970) stimmen damit überein.

Die Oxydierung des Stickstoffes der Seitenkette in Stellung 10 bewirkt sowohl beim Promazin, als auch beim Chlorpromazin eine Verminderung der Albuminbindung um ca. 25 - 30 %. Die Abnahme des Verteilungskoeffizienten ist aber geringer als bei den anderen Metaboliten, die ja zum Teil stärker an Eiweiß gebunden sind. Vermutlich übt die Oxydierung des Stickstoffes der Seitenkette keinen Einfluß auf die Bin-

dungsfähigkeit der Seitenkette aus. Es scheint hauptsächlich die hydrophobe Wechselwirkung des Phenothiazins mit dem Albumin beeinflusst zu werden. Eine Wechselbeziehung zwischen Serumalbuminbindung und Hydrophobie scheint vorzuliegen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden:

Die Oxydierung des Schwefels im aromatischen Ring-system, wie auch die Oxydierung des Stickstoffes der Seitenkette, bewirken eine gleichzeitige Abnahme von Eiweißbindung und Verteilungskoeffizient, was die Annahme von hauptsächlich hydrophoben Bindungsmechanismen zwischen Phenothiazinderivaten und Eiweiß bekräftigt. Demethylierung der Dimethylaminogruppe der Seitenkette verursacht dagegen keine Abnahme, sondern eher eine geringe Zunahme der Eiweißbindung, obgleich ihr Verteilungskoeffizient erheblich abgenommen hat. Vermutlich treten hier ionogene Bindungskräfte in verstärktem Maße auf. Auch das 2-Hydroxypromazin weist auf ionogene Bindungskräfte. Die in früheren Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse, in denen die Einführung eines Chloratoms in Stellung 2 des Benzolringes der Phenothiazine eine Verstärkung der Serumalbuminbindung

bewirkt (z.B. KRIEGLSTEIN und KUSCHINSKY, 1969; GLASSER und KRIEGLSTEIN, 1970), stimmen mit den hier erhaltenen Ergebnissen überein. Der basische Stickstoff der Seitenkette scheint vorwiegend durch ionogene Kräfte an der Bindung beteiligt zu sein.

Zusammenfassung

1. Es wurde die Serumalbuminbindung folgender Metaboliten des Promazin und Chlorpromazin bestimmt: 2-Hydroxypropromazin, Promazinsulfoxid, Chlorpromazinsulfoxid, Desmethylpromazinsulfoxid, Didesmethylpromazin, Didesmethylchlorpromazin, Promazin-N-oxid, Chlorpromazin-N-oxid.

Die Bindung wurde mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration untersucht.

2. Der prozentuale Anteil α an freier, bzw. β an gebundener Substanz, die Gesamtbindungskonstante K_1 , die apparente Bindungskonstante k^+ und die freie Reaktionsenergie ΔF^0 charakterisieren die Wechselwirkung der untersuchten Substanzen mit Albumin.

3. Während bei der Albuminbindung der N-oxydierten- und sulfoxydierten Metaboliten hauptsächlich Hinweise auf hydrophobe Wechselbeziehungen gefunden werden, rücken offenbar bei den demethylierten Metaboliten und 2-Hydroxypromazin ionogene Bindungsmechanismen mit dem Albumin in den Vordergrund.
4. Eine gleichzeitige Abnahme der Verteilungskoeffizienten zwischen n-Octanol und Pufferlösung pH 7,4 und der Albuminbindung ist nur bei den oxydierten Promazin- und Chlorpromazinmetaboliten zu erkennen. Die demethylierten Metaboliten und das 2-Hydroxypromazin zeigen einen solchen Zusammenhang zwischen Albuminbindung und Verteilungskoeffizienten nicht.

Für die Überlassung des Themas und die wertvollen Hinweise bei der Abfassung dieser Arbeit bin ich Herrn Priv.Doiz.Dr.Dr.J.Krieglstein zu großem Dank verpflichtet. Mein Dank gilt ebenfalls der technischen Unterstützung von Fräulein Seufert.

Literaturverzeichnis

BENNHOLD, H.:

Über die Vehikelfunktion der Serumeiweißkörper.

Ergebn.inn.Med.Kinderheilk. 42, 273 (1932).

BIRD, A.E. and A.C. MARSHALL:

Correlation of serum binding of penicillins with
partition coefficients.

Biochem.Pharmac. 16, 2275 (1967).

BRODIE, B.B., in (T.B. Binns, Ed.)

Absorption and distribution of drugs.

Edinburgh: Livingstone 1964.

BRODIE, B.B.:

Displacement of one drug by another from carrier or
receptor sites.

Proc.R.soc.Med. 58, 946 (1965).

BRODIE, B.B.:

Physicochemical and biochemical aspects of pharmacology.

J.Am.med.Ass. 202, 600 (1967).

FRANZ, J.W., JÄHNCHEN, E. und KRIEGLSTEIN, J.:

Der Einfluß verschiedener Pharmaka auf das Bindungsvermögen einer Albuminlösung für Promazin und Chlorpromazin.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 264, 462 (1969).

FUJITA, T., J. IWASA and C. HANSCH:

A new substituent constant, π , derived from partition coefficients.

J.Amer.Chem.Soc. 86, 5175 (1964).

GEIGY, J.R., A.G.:

Pharmazeutische Abteilung: Documenta Geigy, wissenschaftliche Tabellen, 7.Aufl.Basel 1969.

GLASSER, H. und KRIEGLSTEIN, J.:

Die Eiweißbindung einiger Psychopharmaka mit tricyclischem Ringsystem in Abhängigkeit von ihrer chemischen Konstitution.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 265, 321 (1970).

GOLDSTEIN, A.:

The interactions of drugs and plasma proteins.

Pharmacol.Rev. 1, 102 (1949).

GREEN, D.E. and FORREST, I.S.:

In vivo metabolism of chlorpromazin.

Can.Psychiat.Ass.J. 11, 299 (1966).

GREIM, H.:

Therapeutische Möglichkeiten durch die Induzierbarkeit
arzneimittelabbauender Enzyme.

Dtsch.med.Wschr. 95, 2196 (1970).

HANSCH, C., P.P. MALONEY and T. FUJITA:

Correlation of biological activity of phenoxyacetic
acids with hammet substituent constants and partition
coefficients.

Nature (Lond.) 194, 178 (1962).

HANSCH, C., K. KIEHS and G.L. LAWRENCE:

The role of substituents in the hydrophobic bonding
of phenols by serum and mitochondrial proteins.

J.Am.chem.Soc. 87, 5770 (1965).

HOFMANN, P., KRIEGLSTEIN, J., MUTSCHLER, E. und

WOLLERT, U.:

Die Bestimmung der Eiweißbindung einiger Guanylhya-
drazone mit Hilfe der Sephadexgelfiltration.

Arzneimittel-Forsch. 20, 681 (1970).

JÄHNCHEN, E., KRIEGLSTEIN, J. und KUSCHINSKY, G.:

Die Bedeutung der Benzolringe bei der Eiweißbindung
von Promazin und Chlorpromazin.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 263, 375 (1969).

JARDETZKY, O.:

Magnetische Resonanz in der pharmakologischen Forschung.
Naturwissenschaften 54, 149 (1967).

KRIEGLSTEIN, J. und KUSCHINSKY, G.:

Quantitative Bestimmung der Eiweißbindung durch Gel-
filtration.

Arzneimittel-Forsch. 18, 287 (1968).

KRIEGLSTEIN, J.:

Charakterisierung und Bedeutung der Albuminbindung von
Phenothiazinderivaten.

Habilitationsschrift, Mainz 1970

KRIEGLSTEIN, J.:

Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln.

Klin.Wschr. 47, 1125 (1969).

KRIEGLSTEIN, J. und KUSCHINSKY, G.:

Über die Wechselwirkung von Phenothiazinderivaten
mit Rinderserumalbumin.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 262, (1969).

KRIEGLSTEIN, J., FRANZ, J.W. und JÄHNCHEN, E.:

Zunahme der Promazin-Albumin-Bindung, bedingt durch
andere Pharmaka.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 264, 261 (1969).

KURZ, H.:

Die Bedeutung der Lipoidlöslichkeit in der Pharmakologie.
Präparative Pharmazie 1, 1 (1970).

LINDER, A.:

Statistische Methoden, 4. Aufl.Basel-Stuttgart:Birken-
häuser 1964.

MEYER, M.C., and GUTTMAN, D.E.:

The binding of drugs by plasma proteins.

J.pharm.Sci. 57,895 (1968).

NEMETHY, G.:

Hydrophobe Wechselwirkungen.

Angew.Chem. 79, 260 (1967).

NETTER, H.:

Theoretische Biochemie; physikalisch-chemische Grundlagen
der Lebensvorgänge. Berlin, Göttingen und Heidelberg 1959.

SCATCHARD, G.:

The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 660 (1949).

SCHOLTAN, W.:

Über die Bindung der Langezeitsulfonamide an die
Serumeiweißkörper.
Makromolekul.Chem. 54, 24 (1962).

SCHOLTAN, W.:

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.
Arzneimittel-Forsch. 14, 348 (1964).

SCHOLTAN, W.:

Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin
und Ribonucleinsäure.
Arzneimittel-Forsch. 18, 505 (1968).

RAAFLAUB, J.:

Über die Beziehungen zwischen der Lipidlöslichkeit
von Pharmaka und ihrem pharmakokinetischen Verhalten.
Experienta 26, 457 (1970).

Lebenslauf

Am 28.3.1946 wurde ich als Tochter des cand.med.Gerhard Lier und seiner Ehefrau Ingrid, geb. Menge als zweites von vier Kindern in Leipzig geboren. Von 1952 bis 1955 besuchte ich in Leipzig die Grundschule. Nach der Flucht aus der DDR Weihnachten 1955 besuchte ich von Januar bis Juli 1956 die Volksschule in Heidelberg, von August 1956 bis Dezember 1956 wieder die Grundschule in Leipzig und von Januar bis Ostern 1957 die Primarschule in Scherzingen/Schweiz. Bis August 1964 besuchte ich das Heinrich Suso-Gymnasium in Konstanz. Meine Schulzeit beendete ich im Rabanus Maurus-Gymnasium in Mainz, wo ich am 1.3.1966 die Reifeprüfung bestand.

Im April 1966 begann ich mein Medizinstudium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Nach der naturwissenschaftlichen Vorprüfung im Frühjahr 1967, legte ich im Herbst 1968 die ärztliche Vorprüfung ab.

Das Staatsexamen bestand ich am 3. Dezember 1971.

